大腸菌タンパク質発現系の ゴールドスタンダード pET 発現システム活用のポイント

- 発現系選択編 -

pET 発現システムは、培地への IPTG 添加によって T7 RNA ポリメラーゼを誘導し、T7RNA ポリメラーゼ応答性プロモーターの下流にクローニングされた目的遺伝子を高収率で発現させるためのタンパク質発現誘導システムです。

pET 発現システム活用の 3 つのポイント

1. 目的に合致した pET プラスミドの選択
2. プラスミドクローニング用ホスト株の選択
3. タンパク質発現用ホスト株の選択

タンパク質発現実験の必需品
サイズマーカーがお買い得！

50% OFF

DNA &タンパク質 サイズマーカー

半額キャンペーン！

Novagen®

Merck Millipore is a division of MERCK

pET 発現システム活用の 3 つのポイント

ポイント 1

目的に合致した pET プラスミドの選択

pET ベクターの種類（pET- に続く番号）は、下記の 4 項目の組み合わせで決定されています。つまり、適切なプラスミド選択のポイントは実験系に合わせた 4 項目の正しい選択です。

- **T7 プロモーター型の選択：**野生型 T7 プロモーターまたは *lacO* 配列融合プロモーター T7*lac*
- **薬剤耐性遺伝子の選択：**アンピシリン耐性、カナマイシン耐性、またはクロラムフェニコール耐性
- **標識タグ配列の選択：**N 末端タグ、配列内タグ、C 末端タグ、またはタグなし
- **プロテアーゼ切断配列の選択：**Enterokinase、HRV 3C、Thrombin、Factor Xa、またはプロテアーゼ切断配列なし

pET プラスミドの分類

薬剤耐性 ＼ プロモーター	T7	T7*lac*				
アンピシリン耐性	pET-3a-d pET-14b pET-17b pET-20b(+) pET-23a-d(+)	pET-11a-d pET-15b pET-16b pET-19b pET-21a-d(+)	pET-22b(+) pET-25b(+) pET-31b(+) pET-32a-c(+) pET-32 Ek/LIC	pET-32 Xa/LIC pET-43.1a-b(+) pET-43.1 Ek/LIC pET-44a-c(+) pET-45b(+)	pET-46 Ek/LIC pET-51b(+) pET-51 Ek/LIC pET-52b(+) pET-52 3C/LIC	pETcoco-2 pETDuet-1
カナマイシン耐性	pET-9a-d	pET-24a-d(+) pET-26b(+) pET-27b(+) pET-28a-c(+)	pET-29a-c(+) pET-30a-c(+) pET-30 Ek/LIC pET-30 Xa/LIC	pET-39b(+) pET-40b(+) pET-41a-c(+) pET-41 Ek/LIC	pET-42a-c(+) pET-47b(+) pET-48b(+) pET-49b(+)	pET-50b(+)
クロラムフェニコール耐性	-	pETcoco-1				

注 1）a, b, c, d：クローニング部位の *Bam*HI 認識配列 GGATCC に対するリーディングフレームを表します。*Bam*HI 認識配列内のフレームは、a は GGA、b は GAT、c および d は ATC です。d は *Nco*I 認識配列を開始コドンのクローニングに利用できます。

注 2）(+) は、f1 複製機点を持つことを示します。F 因子を持つホスト内で一本鎖 DNA の複製が可能です。

注 3）Ek: Enterokinase、3C: HRV 3C、Xa: Factor Xa

注 4）LIC: Ligation-independent cloning つまり、制限酵素による切断および DNA ライゲースによる結合が不要なクローニング手法です。

注 5）pETcoco は、0.2% グルコース存在下で細胞あたり平均 1 コピーに保たれるプラスミドです。この条件では pETcoco は極めて安定で、突然変異導入確率が 0 にきわめて近く、バックグランドの遺伝子発現レベルは無視できる程度になります。プラスミド調製時は培地に L- アラビノースを添加することで、標的遺伝子の発現誘導を伴わずにプラスミドを細胞あたり約 40 コピーに増幅します。目的遺伝子の発現は IPTG 添加によって誘導されます。

タグ配列の特徴

pET ベクターで利用可能な標識配列	使用目的
DsbA•Tag™ DsbC•Tag™	ジスフィルド結合形成や異性化を触媒するペリプラズム酵素の付加により標的タンパク質の可溶化を促進。
GST•Tag™	発現タンパク質の可溶化を促進。標的タンパク質のアフィニティ精製や定量にもよく利用される。
His•Tag®	変性条件下でも標的タンパク質のアフィニティ精製が可能。ウェスタンブロッティングによる検出も容易。
HSV•Tag®	標的タンパク質のウェスタンブロッティングによる検出が容易。
KSI	フォールディング不要な小タンパク質やペプチドを封入体経由で精製するために用いられるタグ。高度に疎水性の不溶性 Ketosteroidisomerase 融合タンパク質を産生させる。
Nus•Tag™	標的タンパク質の可溶化を促進。 ウェスタンブロッティングによる検出が容易。
PKA 認識配列	Protein Kinase A により認識されるタグ。 標的タンパク質の試験管内リン酸化反応に有効。

pET ベクターで利用可能な標識配列	使用目的
S•Tag™	標的タンパク質のアフィニティ精製および定量が可能。
Signal Sequence	ペリプラズム輸送シグナルを付加し、標的タンパク質の可溶化を促進。
Strep•Tag® II	改変ストレプトアビジン（Strep•Tactin®）を用いることで標的タンパク質の高精度精製が可能。溶出には天然ビオチンアナログ Desthiobiotin（2.5 mM）が使用される。ウェスタンブロッティングによる検出が容易。
T7•Tag®	標的タンパク質のアフィニティ精製が可能。 ウェスタンブロッティングによる検出が容易。
Trx•Tag™	標的タンパク質の可溶化を促進。 ウェスタンブロッティングによる検出が容易。

ポイント

2 プラスミドクローニング用ホスト株の選択の基礎知識

プラスミドを安定に保持可能なクローニング用ホスト（宿主）大腸菌には、相同組み換えタンパク質 RecA ならびに DNA エンドヌクレアーゼ EndA を欠損している K-12 株由来の JM109、DH5 α や NovaBlue などが良く知られています。特に NovaBlue は、*recA*⁻ *endA*⁻ であるだけでなく選択 F 因子を持つ菌株であり、f1 複製起点を持つプラスミドから一本鎖プラスミドを調製可能です。またこれらのホストは、バクテリオファージ CE6 の感染による発現誘導が可能なため、高毒性タンパク質がクローニングされた pET ベクターからの発現誘導にも利用されます。

Blue/White セレクション

NovaBlue
NovaBlue GigaSingles™
NovaBlue T1ᴿ Singles™
Veggie™ NovaBlue Singles™

T1およびT5ファージ耐性

NovaBlue T1ᴿ Singles

アニマルフリー

Veggie NovaBlue Singles

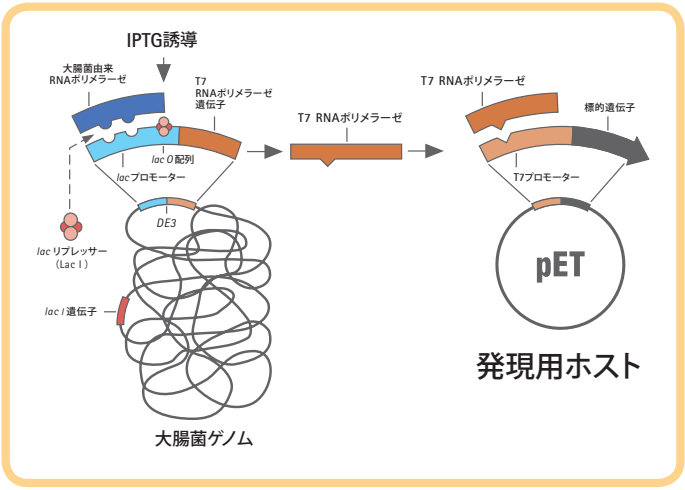
ポイント

3 タンパク質発現用ホスト株の選択のコツ

pET ベクターからのタンパク質発現誘導には、T7 RNA ポリメラーゼを発現可能なホストが必要です。発現用ホスト株は菌株名に (DE3) と記載されており容易に判別可能です。すなわち、pET ベクター発現ホスト株は、*lacI* 遺伝子、*lacUV5* プロモーター、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が *int* 遺伝子内に安定的に挿入されたバクテリオファージ DE3 溶原菌です。

タンパク質発現用ホストには B 株由来の菌株と K-12 株由来の菌株があります。とりわけ B 株由来のホストは、プロテアーゼである Lon および OmpT タンパク質を欠損しているため、目的タンパク質の安定化に寄与しやすいことが知られています。

効率の良い発現実験を実施するためには、適切なホストを選択するとともに、必要に応じて非発現宿主（ネガティブコントロール：(DE3) ではない同種菌株）を使用してください。また、プラスミドの薬剤耐性とホストの薬剤耐性が重複しない組み合わせを選択することも重要なポイントです。



一般的なタンパク質発現

BL21 は、pET ベクターからのタンパク質発現誘導に広く利用されているホスト株です。

BL21(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし

タンパク質不溶化やフォールディング異常の改善 ①

Origami 2、Rosetta-gami 2、Rosetta-gami B は、*trx*B および *gor*522 変異により、ジスルフィド結合形成能が高い株です。ジスルフィド結合形成効率が低い場合のフォールディング効率の改善が期待できます。

Origami™ 2(DE3)	K-12 株由来	ストレプトマイシン耐性、テトラサイクリン耐性
Rosetta-gami™ 2(DE3)	K-12 株由来	ストレプトマイシンン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性
Rosetta-gami B(DE3)	B 株由来	カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性

タンパク質不溶化やフォールディング異常の改善 ②

ラクトース透過酵素 *lacY* に変異を持つ Tuner や Rosetta-gami B は、IPTG 濃度依存性の発現量変化を示します。発現量が高すぎるためにフォールディング効率が落ちている場合に有効な選択です。

Tuner™ (DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし
Rosetta-gami B(DE3)	B 株由来	カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性

毒性タンパクの発現

下記のホストを用いて基底発現を抑制することで、細胞毒性が高いタンパク質の回収率が向上する場合があります。とくに pLysS を持つ株は T7 RNA ポリメラーゼ阻害剤である T7 リゾチームを常に微量生産するため、T7 プロモーター依存性の基底発現が限りなく低く抑制されます。また、ベクターに pETcoco を使用することも一つの手段です。

Tuner(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし
NovaBlue(DE3)	K-12 株由来	テトラサイクリン耐性
すべての pLysS 保有ホスト	B あるいは K-12 株由来	薬剤耐性は菌株によって異なる

完全長のタンパクが得られない

Rosetta シリーズは、大腸菌ではほとんど使用されないコドンに対する tRNA の発現量を高く保っているホストです。

Rosetta(DE3)	B 株由来	クロラムフェニコール耐性
Rosetta 2(DE3)	B 株由来	クロラムフェニコール耐性
Rosetta-gami 2(DE3)	K-12 株由来	ストレプトマイシンン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性
Rosetta-gami B(DE3)	B 株由来	カナマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性
RosettaBlue™(DE3)	K-12 株由来	テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性

発現用プラスミドの安定化

反復配列を持つ標的遺伝子の挿入によりプラスミドが不安定化し、タンパク質発現量が不安定な場合は、下記 *recA*$^-$ のホストによってプラスミドの安定性を向上させることが可能です。

BLR(DE3)	B 株由来	テトラサイクリン耐性
HMS174(DE3)	K-12 株由来	リファンピシン耐性
NovaBlue(DE3)	K-12 株由来	テトラサイクリン耐性

標的タンパクのラベリング

発現タンパク質のラベルには、^{35}S-Met がタンパク質に確実に取り込まれるメチオニン要求性株 B834 が推奨されます。

B834(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし
B834(DE3)pLysS	B 株由来	クロラムフェニコール耐性

アニマルフリー

Veggie は、動物由来成分を含まないコンピテントセルです。

Veggie BL21(DE3)	B 株由来	耐性抗生物質なし
Veggie BL21(DE3)pLysS	B 株由来	クロラムフェニコール耐性

pET システムは特許ライセンスフリーです

pET システムは、米ブルックヘイブン国立研究所（Brookhaven National Laboratory）の付属機関 Brookhaven Science Associates が所有する T7 発現システムの特許 3 件に基づきます。

- US Patent number 4,952,496（2007 年まで）
- US Patent number 5,693,489（2014 年まで）
- US Patent number 5,869,320（2004 年まで）

上記 3 件の特許は 2015 年 1 月以降すべて有効期間が終了しており、pET システムは特許ライセンスフリーです。

ただし、本システムは試験研究用であり、営利目的使用については別途商業利用ライセンスを取得いただく必要が生じる場合があります。

下記に該当する場合を含め、営利目的での使用については弊社テクニカルサポートまでご相談ください。

- Genetics Institute, Inc. がライセンスを保有する pET-32 および pET-48 ベクターを営利目的で使用する場合。
- QIAGEN GmbH がライセンスを保有する His•Tag 技術を営利目的で使用する場合。
- IBA GmbH がライセンスを保有する Strep•Tag 技術および Strep•Tactin 技術を営利目的で使用する場合。
- 米国、欧州、オーストラリアにおいて特許保護されている GST•Tag 技術を営利目的で使用する場合。
- pET システムを商業サービスや商業情報の提供に利用、あるいは医療用品を含む商用製品の製造原料として利用する際に、弊社が公開している製品仕様以上の情報が必要な場合。
- 販売店契約に基づく弊社製品の販売権を有さずに、pET システムあるいはその構成品を販売する場合。

GILSP リストに収載されている pET システムの宿主およびベクター

大腸菌宿主株	ベクター	大腸菌宿主株	ベクター
BL21(DE3) ※1	pET-15b	BL21 ※1	pET-21a(+)
	pET-16b		pET-28a(+)
	pET-19b	BL21(DE3)pLysS ※1	pET-3a
	pET-21a(+)		pET-11a
	pET-21b(+)	Rosetta(DE3) ※1	pET-30a(+)
	pET-21d(+)		pET-32a(+)
	pET-23b(+)	B および B 由来株 ※2	pET-3a
	pET-23d(+)		pET-22b(+)
	pET-28b(+)		pET-28a(+)
	pET-30a(+)		
	pET-50b(+)		

※ 1　経済産業大臣が定める GILSP 遺伝子組み換え生物リスト（平成 26 年 12 月 9 日最終改正版）に収載されています。

※ 2　厚生労働大臣が定める GILSP 遺伝子組み換え生物リスト（平成 23 年 11 月 11 日最終改正版）に収載されています。

注）　上の表は、遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令の別表第一号に収載されいている宿主およびベクターです。GILSP 遺伝子組換え微生物として認められるためには、上掲の宿主株、ベクターと同省令別表第二号に収載されている任意の挿入 DNA を組み合わせる必要があります。

pET システムは幅広い製品を提供しています　pET プラスミド約 80 種およびホスト株約 65 種

下記製品リストはプラスミド、クローニング用ホストおよび発現用ホストの代表例です。

pET プラスミド

ベクター	プロモーター	選択用抗生物質	N 末タグ	C 末タグ	プロテアーゼ切断サイト	包装単位	カタログ番号	希望販売価格
pET-15b DNA	T7*lac*	アンピシリン	His	-	Thrombin	10 µg	69661-3	¥38,000
pET-21(+) DNA	T7*lac*	アンピシリン	-	His	-	10 µg	69770-3	¥38,000
pET-28a(+) DNA	T7*lac*	カナマイシン	His/T7	His	Thrombin	10 µg	69864-3	¥38,000
pETcoco1 DNA	T7*lac*	クロラムフェニコール	His/S	HSV	-	10 µg	71129-3	¥57,000

DNA クローニング用ホスト

製品名	用途	形質転換効率	耐性遺伝子	由来	包装単位	カタログ番号	希望販売価格
NovaBlue Singles Competent Cells	一般的な DNA クローニング	>1.5 × 10^8	テトラサイクリン	K-12 株	11 反応分	70181-3	¥23,000
					22 反応分	70181-4	¥43,000
NovaBlue GigaSingles Competent Cells	高効率の DNA クローニング	>1.0 × 10^9	テトラサイクリン	K-12 株	11 反応分	71227-3	¥31,000
					22 反応分	71227-4	¥60,000

タンパク質発現用ホスト

製品名	主な特長	包装単位	カタログ番号	希望販売価
Rosetta(DE3) Competent Cells	大腸菌のレアコドンに対応する 6 種の tRNA が高発現しており、完全長タンパク質を得やすい株です。	0.4 mL	70954-3	¥20,000
		1 mL	70954-4	¥35,000
Rosetta 2(DE3) Competent Cells	大腸菌のレアコドンに対応する 7 種の tRNA が高発現しており、完全長タンパク質を得やすい株です。	0.4 mL	71397-3	¥20,000
		1 mL	71397-4	¥36,000
Rosetta-gami 2(DE3) Competent Cells	7 種のレアコドン tRNA の高発現に加え、ジスフィルド結合形成能が高い株です。	0.4 mL	71351-3	¥20,000
		1 mL	71351-4	¥36,000

ホストとベクターの組み合わせ選定などのご相談は、弊社テクニカルサポート　0120-633-358　までご連絡ください。

製品詳細情報、カタログ・資料のご請求は、弊社 Web サイト www.merckmillipore.jp をご利用ください。

pET 発現システムの取扱説明書
pET System Manual もぜひご請求ください。

Novagen®

タンパク質発現実験の必需品 サイズマーカーがお買い得！
DNA & タンパク質サイズマーカー半額キャンペーン

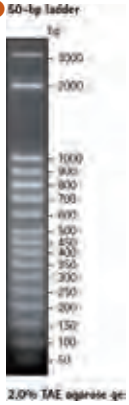
50% OFF

期間中キャンペーン対象製品を 50% OFF にてお届けします

キャンペーン期間：2015 年 4 月 6 日～ 6 月 5 日ご注文分まで

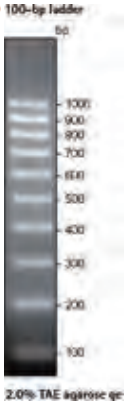
	キャンペーン対象製品名	付属ローディングバッファー	包装単位	カタログ番号	希望販売価格	キャンペーン希望販売価格
❶	Perfect DNA™ Ladders, 50 bp Ladder (50-3,000 bp)	6X Loading Buffer (1 mL)	100 Lanes	70538-3	~~¥24,000~~	¥12,000
❷	Perfect DNA Ladders, 100 bp Ladder (100-1,000 bp)	6X Loading Buffer (1 mL)	100 Lanes	70539-3	~~¥24,000~~	¥12,000
❸	Perfect DNA Ladders, 1 kbp Ladder (500-10,000 bp)	6X DNA Gel Loading Buffer (1 mL)	100 Lanes	70537-3	~~¥24,000~~	¥12,000
	キャンペーン対象製品名	**特長**	**包装単位**	**カタログ番号**	**希望販売価格**	**キャンペーン希望販売価格**
❹	Perfect Protein™ Markers, 10-225 kDa	CBB 染色用に最適化された正確なサイズマーカー	100 Lanes	69079-3	~~¥22,500~~	¥11,000
❺	Perfect Protein Markers, 15-150 kDa	CBB 染色用に最適化された正確なサイズマーカー	100 Lanes	69149-3	~~¥23,000~~	¥11,500
❻	Perfect Protein Western Markers (15-150 kDa)	S•Tag/His•Tag 融合タンパク質から構成される正確なサイズマーカー。HRP 標識 S タンパク質や HRP 標識抗 His•Tag 抗体などを用いて検出可能	25 Lanes	69959-3	~~¥10,500~~	¥5,000
❻	Perfect Protein HRP Western Blot Kit (15-150 kDa)	Perfect Protein Western Markers と HRP 標識 S タンパク質のキット品	25 Blots	69078-3	~~¥27,000~~	¥13,500
	Strep•Tag II Perfect Protein Markers, 16–100 kDa	抗 Strep•Tag II モノクローナル抗体で検出可能な正確なサイズマーカー。Strep•Tag II 標識タンパク質用のサイズマーカーとして利用される	100 Lanes	71614-3	~~¥37,000~~	¥18,500
❼	Trail Mix™ Protein Markers (10-225 kDa)	染色済タンパク質と未染色タンパク質で構成される正確なサイズマーカー 染色済バンド：15, 16, 100 kDa 未染色バンド：10, 15, 16, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 225 kDa	100 Lanes	70980-3	~~¥23,000~~	¥11,500
	Trail Mix Western Markers (15-225 kDa)	染色済タンパク質と未染色 S•Tag 融合タンパク質で構成される正確なサイズマーカー 染色済バンド：15, 16, 100 kDa S タンパク質標識済バンド：15, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 225 kDa	25 Lanes	70982-3	~~¥12,000~~	¥6,000
	Trail Mix HRP Western Blot Kit (15-225 kDa)	Trail Mix Western Markers と HRP 標識 S タンパク質のキット品	25 Blots	71048-3	~~¥30,000~~	¥15,000
	S-protein HRP Conjugate	S•Tag 検出用 HRP 標識済 S タンパク質	50 µL	69047-3	~~¥26,000~~	¥13,000
	Protein Molecular Weight Markers, HPLC (12.4-290 kDa)	5 種類の高純度タンパク質から構成される HPLC 用タンパク質サイズマーカー	5 Tests	539053-5T	~~¥35,000~~	¥17,500
	キャンペーン対象製品名	**組成**	**包装単位**	**カタログ番号**	**希望販売価格**	**キャンペーン希望販売価格**
	6X DNA Gel Loading Buffer	Bromphenol Blue, Xylene Cyanol FF, Ficoll	5 mL	69046-3	~~¥9,000~~	¥4,500
	6X Loading Buffer	Orange G, Xylene Cyanole FF, Glycerol	5 mL	69180-3	~~¥9,000~~	¥4,500
	4X SDS Sample Buffer	DTT 含有（2X での使用可）	2 mL	70607-3	~~¥5,100~~	¥2,500

❶ 50-bp ladder



2.0% TAE agarose ge

❷ 100-bp ladder

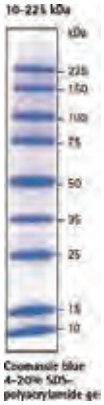


2.0% TAE agarose ge

❸ 1-kbp ladder

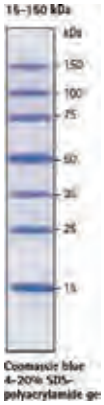
0.8% TAE agarose ge

❹ 10-225 kDa



Coomassie blue 4-20% SDS-polyacrylamide ge

❺ 15-150 kDa

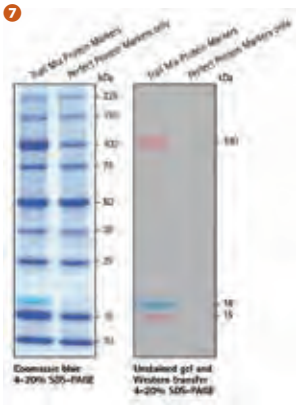


Coomassie blue 4-20% SDS-polyacrylamide ge

❻

Antibody + S-protein HRP

❼



メルクミリポア製品の最新情報を配信

メルクミリポア公式 Facebook ページ
https://www.facebook.com/merckmilliporej

メルクミリポア公式 Twitter アカウント
https://twitter.com/MerckMilliporeJ

メルクミリポア E- メールニュース
http://www.merckmillipore.jp/wm

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのであらかじめご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。Merck Millipore and the M mark are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany.

メルク株式会社
メルクミリポア ラボジャパン事業本部 バイオサイエンス営業部
リサーチセールスグループ
〒153-8927 東京都目黒区下目黒1-8-1 アルコタワー5F
製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp
お問合せ▶On-Line:www.merckmillipore.jp/jpts Tel: 0120-633-358 Fax: 03-5434-4859
[BIM143]1503-pdf/M WEB